

DS.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 02/066489 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07J 1/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01878

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. Februar 2002 (21.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 09 898.7 21. Februar 2001 (21.02.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): NOVOSOM AG [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120  
Halle (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PANZNER, Steffen  
[DE/DE]; Blumenstrasse 9, 06108 Halle (DE). ENDERT,  
Gerold [DE/DE]; Seebener Strasse 20, 06114 Halle  
(DE). FANKHÄNEL, Stefan [DE/DE]; Herderstrasse  
9, 06114 Halle (DE). EL-MOKDAD, Nasr [DE/DE];  
Bertranstrasse 10, 06110 Halle (DE).

(74) Anwälte: ZIEBIG, Marlene, K. usw.; Gulde Hengelhaupt  
Ziebig & Schneider, Schützenstrasse 15 - 17, 10117 Berlin  
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: AMPHOTERIC STEROLS AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: AMPHOTERE STEROLE UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a sterol skeleton based compound wherein one or several amphoteric groups with an iso-  
electric point of between 4 and 9 are substituted on the 3<sup>rd</sup> position of the ring system, in addition to liposomes containing said  
compounds.

(57) Zusammenfassung: Es wird eine amphotere Verbindung auf Basis eines Sterolgerüsts vorgeschlagen, wobei an die 3-Position  
des Ringsystems eine oder mehrere amphotere Gruppen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 9 substituiert sind sowie  
Liposomen, die diese Verbindungen enthalten.

WO 02/066489 A2

---

## Amphotere Sterole und deren Verwendung

---

5

Die Erfindung betrifft amphotere Verbindungen auf Basis eines Sterolgerüsts, wobei an die 3-Position des Ringsystems eine oder mehrere amphotere Gruppen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 9 substituiert sind sowie Liposomen, die diese Verbindungen enthalten.

Unter dem Begriff der Lipide werden drei Klassen von Naturstoffen zusammengefasst, die sich aus biologischen Membranen isolieren lassen: Phospholipide, Sphingolipide und Cholesterol mit seinen Derivaten.

Von technischem Interesse sind diese Substanzen bei der Herstellung von Liposomen. Diese Liposomen lassen sich unter anderem als Container für Wirkstoffe bei pharmazeutischen Zubereitungen einsetzen. Wünschenswert ist dabei eine effiziente und stabile Verpackung des Cargos und eine kontrollierbare Freisetzung des Inhalts. Beide Ansprüche sind nicht ohne weiteres zu vereinen: Je stabiler und dichter die Verpackung ist, desto schwerer gibt sie den eingeschlossenen Wirkstoff wieder frei. Aus diesem Grund wurden Liposomen entwickelt, die ihre Eigenschaften als Reaktion auf einen äußeren Reiz verändern. Bekannt sind thermosensible und pH-sensitive Liposomen. Die pH-sensitiven Liposomen sind von besonderem Interesse, da dieser Parameter sich auch unter physiologischen Umständen, etwa bei der endozytotischen Aufnahme eines Liposoms in Zellen oder bei der Passage des Magen-Darm-Trakts, ändern kann. Nach dem Stand der Technik

umfassen pH-sensitive Liposomen insbesondere Cholesterolhemisuccinat (CHEMS).

Cholesterolhemisuccinat wird in Mischung mit  
5 Phosphatidylethanolamin zur Herstellung pH-sensitiver Liposomen verwendet (Tachibana et al.(1998); BBRC 251: 538-544, US4891208). Solche Liposomen können von Zellen endozytiert werden und vermögen auf diesem Weg Cargomoleküle in das Innere von Zellen zu transportieren, ohne die  
10 Integrität der zellulären Membran zu verletzen.

Ein wesentlicher Nachteil des CHEMS ist dessen anionischer Charakter. Die damit hergestellten Liposomen besitzen eine negative Gesamtladung und werden nur mit geringer Effizienz  
15 von Zellen aufgenommen. Trotz des oben beschriebenen Transfermechanismus eignen sie sich daher kaum für den Eintransport von Makromolekülen in Zellen.

Der Stand der Technik beschreibt in der WO 00/59474  
20 Verbindungen mit einem Membrananker und einer kationischen und anionischen Kopfgruppe, wobei die anionische Gruppe über eine Disulfidbrücke mit der Grundstruktur verbunden ist. Diese Disulfidbrücke kann unter physiologischen Bedingungen, etwa bei Kontakt mit dem Cytosol, reduziert werden, die  
25 anionische Kopfgruppe wird dann freigesetzt und das Gesamtmolekül erhält eine positive Ladung und ermöglicht die Fusion mit der Zellmembran. Nachteilig ist das Toxizitätsprofil und die Lagerstabilität der in WO 00/59474 offenbarten Verbindungen, da durch die Abspaltung der  
30 Disulfidbrücken freie kationische Lipide entstehen. Für diese Verbindungen ist es bekannt, dass sie nachteilhafterweise eine zytotoxische Wirkung besitzen.

Für den Eintransport von Wirkstoffen in Zellen (Transfektion) werden fachgemäß kationische Liposomen verwendet, die über eine möglichst hohe und konstante Oberflächenladung verfügen. Die positive Gesamtladung solcher Partikel führt zu einer  
5 elektrostatischen Anheftung an Zellen und in der Folge zu einem effizienten Eintransport. Der Einsatz dieser Verbindungen und der damit hergestellten Liposomen bleibt aber auf Anwendungen in vitro oder ex vivo beschränkt, da solche positiv geladenen Liposomen mit Serumbestandteilen  
10 unkontrollierte Aggregate bilden.

Es bestand daher die Aufgabe, neue Verbindungen herzustellen,

- 15 i) mit deren Hilfe Wirkstoffe in Liposomen eingeschlossen und bei einer Veränderung des pH-Wertes wieder freigesetzt werden können,
- ii) durch deren Anwesenheit die Herstellung von amphoteren Liposomen gelingt, die unter physiologischen Bedingungen mit Serum gemischt werden  
20 könne, ohne dass es zur Aggregation kommt und
- iii) mit deren Hilfe Liposomen hergestellt werden können, die einen eingeschlossenen Wirkstoff in das Innere von Zellen transportieren können.

25 Eine weitere Aufgabe der Erfindung bestand darin, dass die Verbindungen sich einfach und preiswert herstellen lassen und in hohem Anteil in liposomale Membranen eingebaut werden können.

30 Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch Sterolderivate mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4,5 und 8,5 nach der allgemeinen Formel

Amphoter - Y - Spacer - X - Sterol,

wobei Y und X verbindende Gruppen darstellen.

5 Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch Konjugation von amphoteren Gruppen an die 3-Position eines Sterolgerüsts gelöst. Je nach verwendetem Amphoter werden Verbindungen erhalten, die bei einem spezifischen pH-Wert ihre Ladung ändern und sich überraschenderweise zu einem hohen Anteil in  
10 liposomale Membranen einbauen lassen. Als Ausgangsverbindung können einfache und billige Sterole oder deren Derivate verwendet werden.

Zwischen dem Amphoter und dem Sterolgerüst liegen die  
15 Molekülfragmente: - Y - Spacer - X. Der Spacer ist z.B. ein Niederalkylrest mit linearer Struktur, der 0 bis 8 C-Atome besitzt und 2 ethylenische ungesättigte Bindungen enthält. Der Spacer kann zur Erhöhung der Polarität des Moleküls Hydroxylgruppen besitzen.

20

Im Zusammenhang mit der Erfindung sollen folgende Abkürzungen verwendet werden:

CHEMS	Cholesterolhemisuccinat
25 PC	Phospatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PS	Phosphatidylserin
Hist-Chol	Histidiny-cholesterolhemisuccinat

30 Unter den membranbildenden oder membranständigen Gruppen einer biologischen Bilayermembran sind die Sterole von besonderem Interesse, da diese Verbindungen insbesondere billig verfügbar sind, eine einfache Chemie aufweisen und in

einem hohen Anteil in Membranen eingebaut werden können, ohne deren Permeabilität zu erhöhen oder gar den Membrancharakter völlig zu zerstören. Wichtig für den Erhalt der letztgenannten Charakteristik ist jedoch, dass die Substitution mit einem polaren Molekül an der 3-Position des Sterols erfolgt.

Das Gesamtmolekül erhält seine pH-abhängige Ladungscharakteristik durch die gleichzeitige Anwesenheit von kationischen und anionischen Gruppen im Molekülteil "Amphoter". Ein Amphoter ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass bei einem bestimmten pH-Wert die Summe seiner Ladungsbestandteile gerade Null ist. Dieser Punkt wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Oberhalb des pI ist die Verbindung negativ geladen, unterhalb des pI ist sie als positives Kation aufzufassen; wobei der pI der erfindungsgemäßen Verbindungen bzw. Sterolderivate zwischen 4,5 und 8,5 liegt.

Die Gesamtladung des Moleküls bei einem bestimmten pH-Wert des Mediums kann wie folgt berechnet werden:

$$z = \sum n_i * ((q_i - 1) + (10^{(pK - pH)} / (1 + 10^{(pK - pH)})))$$

$q_i$  absolute Ladung der ionischen Gruppe unterhalb ihres pK (Beispiel: Carboxyl = 0, einfache Stickstoffbase = 1)  
 $n_i$  Anzahl dieser Gruppen im Molekül

Eine erfindungsgemäße Verbindung entsteht beispielsweise durch Kopplung der Aminogruppe des Histidins an Cholesterolhemisuccinat. Das Produkt ist bei einem neutralem pH-Wert von 7 negativ geladen, da die vorhandene Carboxylfunktion voll dissoziiert vorliegt und die

Imidazolfunktion nur gering aufgeladen ist. Bei einem sauren pH-Wert von etwa 4 sind die Verhältnisse umgekehrt: die Carboxylfunktion ist nun weitgehend entladen, die Imidazolgruppe jedoch voll protoniert, die Gesamtladung des Moleküls ist daher positiv.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung weist das Sterolderivat einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 auf.

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung umfasst das Amphoter ein oder mehrere Kationen mit einem pKa-Wert zwischen 4 und 8 und gleichzeitig ein oder mehrere Anionen mit einem pKa-Wert zwischen 3 und 7. Eine vorteilhafte Auswahl von Art und Anzahl der funktionellen Gruppen kann anhand der oben genannten Formel vorgenommen werden.

Es ist zweckmäßig, funktionelle Gruppen oder Molekülfragmente als Ladungsträger zu verwenden, die im pH-Bereich zwischen 4 und 9 insbesondere dissoziiert vorliegen. Dazu gehören beispielhaft die Phosphorsäuregruppen, die Sulfonsäuregruppen oder andere starke Anionen. Dazu gehören aber auch die primären, sekundären oder tertiären Aminogruppen, soweit sie nicht oben genannt sind. Dazu gehören die quartären Ammonium-, Amidinium-, Pyridimnium- und die Guanidinogruppen.

Diese feststehenden Ladungen lassen sich dann durch die beschriebenen veränderlichen Ladungen überkompensieren. Das heißt, dass die veränderlichen Ladungsträger beispielsweise in einem Überschuss eingesetzt werden. Vorteilhaft bei der Verwendung voll dissoziierter Gruppen ist deren starke

Polarität. Bevorzugte Strukturfragmente aus dieser Gruppe sind die Sulfonsäuren, Phosphorsäuren, primäre, sekundäre oder tertiäre Amine, Ammoniumverbindungen, Quanidiniumverbindungen, Amidiniumverbindungen oder  
5 Pyridinidumverbindungen, die mit einem der oben benannten Spacer und Kopplungsgruppen mit dem Molekül verknüpft sind.

Amphotere können besonders bevorzugt als komplette Struktureinheiten vorliegen. Das ist beispielhaft der Fall  
10 bei den o-, m- oder p-Aminobenzoesäuren, der Imidazolcarbonsäure, der Imidazoldiessigsäure oder auch der Nicotinsäure oder Picolinsäure. Amphotere können insbesondere aus zwei Ladungsträgern zusammengesetzt sein, die beide im benannten pH-Bereich zwischen 4 und 9 ihre Ladung wechseln.  
15 Der gleichzeitig stattfindende Verlust an anionische Ladung und Gewinn an kationische Ladung führt zu einem Ladungswechsel des Gesamtmoleküls.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante der  
20 Erfindung umfasst das Kation ein Imidazol, Piperazin, Morpholin, Purin und/oder Pyrimidin. Weitere vorteilhafte Kationen mit dieser Eigenschaft sind im wesentlichen alle weiteren Stickstoffbasen. Insbesondere wenn die Stickstoffbasen als Ringsysteme vorliegen, existieren  
25 vorteilhafterweise Stellungsisomere, bei denen der verbindende Spacer an verschiedenen Positionen des organischen Kations substituiert ist. Durch die Stellungsisomerie lassen sich zweckmäßigerweise die pKa-Werte der organischen Kationen beeinflussen. Die dem zugrunde  
30 liegenden Regeln sind dem Fachmann bekannt. Alternativ können diese Einflüsse aus Tabellenwerken abgeschätzt werden (Handbook of Chemistry and Physics, 73. Band, S. 8 - 37 ff.).



Durch Ankopplung entstehen mit Vorteil amphiphile organische Kationen, die beispielsweise aus den folgenden Stoffklassen stammen:

o-, m-, p-Aniline; 2-,3- oder 4-substituierte Anisidine,  
5 Toluidine oder Phenetidine; 2-, 3-, 5-,6-, 7-oder 8-  
substituierte Benzimidazole, 2-, 3, 4- oder 5-substituierte  
Imidazole, 1-, oder 5-substituierte Isochinoline, 2-,3- oder  
4- substituierte Morpholine, 2-,3- oder 4- substituierte  
Picoline, 1-, 2-,oder 3- substitutierte Piperazine, 2-, 5-  
10 oder 6-modifizierte Pterine, 3-,4-, 5-, 6- oder 9-  
substituierte Purine, 2- oder 3- substituierte Pyrazine, 3-  
oder 4- substituierte Pyridazine, 2-, 3- oder 4- modifizierte  
Pyridine, 2- , 4-, 5- oder 6-subsituierte Pyrimidine, 1-,2-  
,3-,4-,5-, 6- oder 8- substituierte Chinoline, 2-, 4- oder 5-  
15 substituierte Thiazole, 2-, 4- oder 6- substituierte  
Triazine, oder auch Abkömmlinge des Tyrosins. Besonders  
bevorzugt sind die genannten Piperazine, Imidazole und  
Morpholine, Purine oder Pyrimidine. Ganz besonders bevorzugt  
sind solche Molekülfragmente, wie sie in biologischen  
20 Systemen vorkommen, also beispielsweise 4-Imidazole  
(Histamine, Histidin selbst), 2-,6- oder 9- Purine  
(Adenine, Guanine, Adenosine oder Guanosine), 1-, 2- oder 4-  
Pyrimidine (Uracile, Thymine, Cytosine, Uridine, Thymidine,  
Cytidine) oder auch Pyridin-3-carbonsäuren. Die hier  
25 genannten Strukturfragmente können weitere Substituenten  
aufweisen. Das können beispielsweise Methyl-, Ethyl-, Propyl-  
oder Isopropylreste sein, besonders bevorzugt in  
hydroxylierte Form mit einer oder zwei Hydroxylgruppen. Das  
können aber auch Hydroxyl- oder Ketofunktionen des  
30 Ringsystems sein.

Stickstoffbasen mit bevorzugten pKa-Werten entstehen  
beispielsweise auch durch einfache oder mehrfache

Substitution des Stickstoffatoms mit Niederalkanhydroxylen, etwa Hydroxymethyl- oder Hydroxyethylgruppen. Geeignete organische Basen aus dieser Gruppe sind beispielsweise Aminopropandiole, Triethanolamine, Tris-  
5 (hydroxymethyl)methylamine, Bis-(hydroxymethyl)methylamine, Tris-(hydroxyethyl)methylamine, Bis-(hydroxyethyl)methylamine oder die entsprechend substituierten Ethylamine.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform sind die  
10 anionischen Ladungsträger Carboxylgruppen. Selbstverständlich können alle Carbonsäuren als Ladungsträger eingesetzt werden. Dazu gehören insbesondere aliphatische, geradkettige oder verzweigte Carbonsäuren mit bis zu 8 C-Atomen und 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen. Beispielhafte  
15 Verbindungsteile sind die Carboxylgruppe selbst, die in der aliphatischen Kette gebundene Essigsäure, Bromessigsäure, Chloressigsäure, Acetoessigsäure, Propionsäure, Acrylsäure, Buttersäure, Crotonsäure oder höhere Carbonsäure, die einfach veresterte oder amidierte oder in der aliphatischen Kette  
20 gebundene Dicarbonsäure wie Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Caprylsäure, Pimelinsäure, Suberinsäure, Cyclohexandicarbonsäure oder auch Cyclopentandicarbonsäure; die einfach veresterte oder  
25 amidierte oder im aliphatischen Teil gebundene Oligocarbonsäure wie Citronensäure, Isocitronensäure oder Ethylendiamintetraessigsäure.

Weitere vorteilhafte Verbindungsteile sind die in der  
30 Seitenkette über ein Heteroatom gebundene Glykolsäure, Milchsäure, Hydroxybuttersäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Asparginsäure oder Glutaminsäure, Alanin, Glycin, Serin,

Threonin, Asparagin, Glutamin, Prolin, Tyrosin oder Cystein oder andere Aminosäure oder Hydroxysäure.

Carbonsäuren mit einem geeigneten Verhalten findet man auch  
5 als Substituenten aromatischen Systeme, etwa als Benzoessäure, Anissäure, o-, m- oder p-Hydroxybenzoessäure, als Dihydroxybenzoessäure, Gallussäure, Zimtsäure, Phenyllessigsäure, Hippursäure, Pthalsäure, Terephtalsäure, 2,3 oder 4-Pyridincarbonsäure, Furancarboxylsäure. Andere  
10 anionische Gruppen sind dissoziierbare Hydroxyle oder Thiole, wie sie in der Ascorbinsäure, dem N-substituierten Alloxan, der N-substituierten Barbitursäure, im Veronal, dem Phenol oder als Thiolgruppe vorkommen.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Amphotere Peptide und umfassen 1 bis 10 Aminosäuren. Besonders bevorzugt werden in einer weiteren Ausführungsform insbesondere die Aminosäuren Histidin, Arginin, Lysin, Glutaminsäure oder Asparaginsäure zur Bildung des Amphoters  
20 und zur Bestimmung seiner Ladungscharakteristik verwendet. Weitere bevorzugte Aminosäuren sind Glycin, Serin, Threonin, Glutamin, Asparagin, aber auch Cystein, die zur Erhöhung der Polarität und damit zur Verbesserung der Löslichkeit des Amphoters beitragen.

25

In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung sind die Sterole, Cholesterol, Sitosterol, Campesterol, Desmosterol, Fucosterol, 22-Ketosterol, 20-Hydroxysterol, Stigmasterol, 22-Hydroxycholesterol, 25-Hydroxycholesterol,  
30 Lanosterol, 7-Dehydrocholesterol, Dihydrocholesterol, 19-Hydroxycholesterol, 5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol, 7-Hydroxycholesterol, Epicholesterol, Ergosterol und/oder Dehydroergosterol sowie andere verwandte Verbindungen. Die

mit Vorteil als Ausgangsstoff verwendeten Sterole können an ihrer 3-Position verschiedene Gruppen tragen, die zweckmäßigerweise eine einfache und beständige Ankopplung erlauben oder optional die Funktion eines räumlichen Spacers erfüllen. Besonders geeignet für eine direkte Kopplung sind die natürlicherweise vorhandene Hydroxylgruppe, aber auch das Chlor der Sterolchloride oder die Aminogruppe der Sterolamine oder die Thiolgruppe des Thiocholesterols.

10 In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung umfasst die verbindende Gruppe X die Struktur  $-(C=O)-O-$ ;  $-(C=O)-NH-$ ;  $-NH-(C=O)-O-$ ;  $-(C=O)-S-$ ;  $-O-$ ;  $-NH-$ ;  $-S-$  oder  $-CH=N-$ . Vorteilhafterweise entspricht die verbindende Gruppe Y in ihrer Struktur der Gruppe X, zusätzlich kann sie die  
15 Struktur  $-O-(O=C)-$ ;  $-S-(O=C)-$ ;  $-NH-(O=C)-$ ;  $-O-(O=C)-NH-$  oder  $-N=CH-$  umfassen. Die Gruppe Y kann beispielsweise entfallen, wenn sich das Amphoter direkt an das Sterolgerüst koppeln lässt, beispielsweise bei der Veresterung von Imidazol-4,5-dicarbonsäure mit Cholesterol.

20

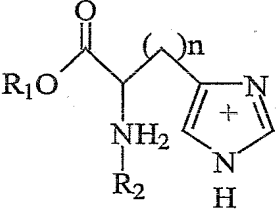
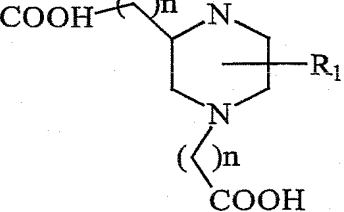
In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung ist der Spacer ist ein Niederalkylrest mit linearer, verzweigter oder ringförmiger Struktur, der 0 bis 8 C-Atome besitzt und 0, 1 oder 2 ethylenische ungesättigte Bindungen enthält. Der  
25 Spacer kann zur Erhöhung der Polarität des Moleküls Hydroxylgruppen besitzen. Der Spacer kann insbesondere ein Zucker sein, vorteilhafterweise auch ein Polyethylenglykol, wobei dieser bis zu 20 Monomereinheiten umfassen kann.

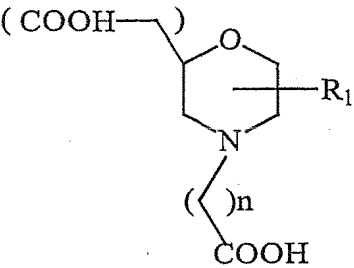
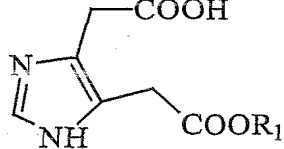
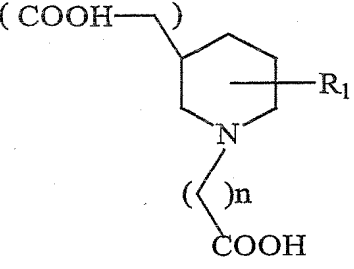
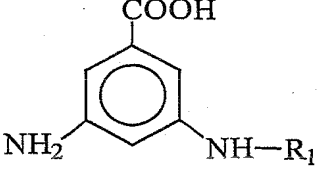
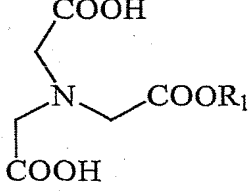
30 Methoden zur Ausführung solcher Kopplungsreaktionen sind dem Fachmann bekannt und werden je nach verwendetem Ausgangsstoff und Kopplungskomponente variieren. Typische Reaktionen sind die Veresterung, die Amidierung, die Addition von Aminen an

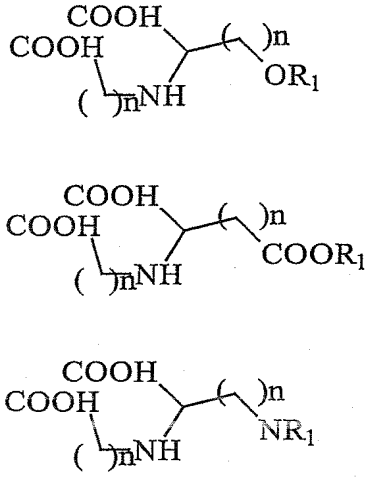
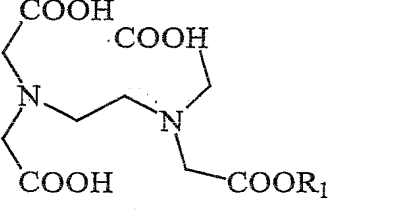
Doppelbindungen, die Veretherung oder auch die reduktive Aminierung.

Besonders bevorzugte Moleküle lassen sich durch Amidierung  
 5 oder Veresterung von Cholesterolhemisuccinat oder durch die  
 Bildung des Carbamoyls aus Cholesterolchloroformiat oder auch  
 durch direkte Veresterung mit Cholesterol herstellen. Zu den  
 besonders bevorzugten Amphoteren gehören beispielsweise die  
 folgenden Verbindungen in Tab. 1, wobei R1 oder R2 den  
 10 lipophilen Teil des amphoteren Sterols bedeuten und ( )n  
 weitere Molekülteile im Sinne des oben definierten Spacers  
 darstellen.

15 **Tabelle 1**

	<p>Histidin-Derivate.</p> <p>Bevorzugt erfolgt die Ankopplung des Sterols über die Aminogruppe als R2. R1 bildet in diesem Fall ein Anion und kann beispielsweise H oder eine Hydroxycarbonsäure oder eine oder mehrere Aminosäuren sein.</p> <p>Erfolgt die Ankopplung über R1, dann ist R2 ein anionischer Rest, etwa eine Carbonsäure oder Dicarbonsäure.</p>
	<p>Piperazin-Derivate.</p> <p>Die Ankopplung des Sterols kann über eines der Ringatome erfolgen. Sind die Seitenketten als Hydroxycarbonsäuren oder Aminosäuren ausgeführt, so kann die Ankopplung vorteilhafterweise über diese Heteroatome erfolgen.</p>

	<p><b>Morpholin-Derivate</b></p> <p>Die Ankopplung des Sterols kann über eines der Ringatome erfolgen. Sind die Seitenketten als Hydroxycarbonsäuren oder Aminosäuren ausgeführt, so kann die Ankopplung vorteilhafterweise über diese Heteroatome erfolgen.</p>
	<p><b>Derivate der Imidazol-4,5-diessigsäure.</b></p> <p>Die Anbindung des Sterols erfolgt bevorzugt als Ester einer der beiden Essigsäurefunktionen. Das Sterols kann aber auch an die 3-Aminofunktion angebunden sein.</p>
	<p><b>Derivate des Piperidins.</b></p> <p>Die Ankopplung des Sterols kann über eins der Ringatome erfolgen. Sind die Seitenketten als Hydroxy- oder Aminosäuren ausgeführt, dann kann die Ankopplung vertielhaft über deren Heteroatome erfolgen.</p>
	<p><b>Diaminobenzoessäure-Derivate.</b></p> <p>Hier erfolgt die Ankopplung des Sterol bevotzugt über eine der beiden Aminogruppen. Die zweite Aminogruppe kann beispielsweise alkyliert sein, um einen höheren pKa-Wert zu erhalten.</p>
	<p><b>Trinitriloessigsäure-Derivate.</b></p> <p>Amphotere Gruppen entstehen auch durch Veresterung von Trinitriloessigsäure. Das Ladungsverhalten dieser Verbindungen kann zusätzlich durch die Komplexierung von Metallionen verändert werden.</p>

	<p><b>Na-Alkylcarboxy-Aminosäure-Derivate</b></p> <p>Amphotere Verbindungen entstehen auch hier durch Kopplung von Sterolen an die endständigen Gruppen von N-Acylaminosäuren. Die Struktur kann vorteilhaft vom Serin, der Asparaginsäure oder Glutaminsäure oder vom Lysin oder Ornithin abgeleitet werden. Die Aminodicarbonsäuren können nicht nur endständig, sondern auch an den anderen Säuregruppen gekoppelt sein. Das Ladungsverhalten dieser Verbindungen kann zusätzlich durch die Komplexierung von Metallionen verändert werden.</p>
	<p><b>EDTA-Derivate</b></p> <p>Amphotere Gruppen entstehen auch durch Veresterung von Trinitriloessigsäure. Das Ladungsverhalten dieser Verbindungen kann zusätzlich durch die Komplexierung von Metallionen verändert werden.</p>

Die Erfindung betrifft auch Liposomen, die die erfindungsgemäßen Sterolderivate umfassen. Die

5 erfindungsgemäßen Verbindungen lassen sich in einem hohen Anteil in liposomale Membranen einbauen und führen erst dann zu einer positiven Ladung des Gesamtpartikels, wenn der pH-Wert des Mediums den isoelektrischen Punkt des Amphoters unterschreitet. Liposomen, umfassend die erfindungsgemäßen

10 Komponenten können unter geeigneten Bedingungen mit Polymeren beschichtet werden. Dabei kann eine einfache oder mehrfache

Abscheidung solcher Substanzen auf der Oberfläche erfolgen. Bei einer mehrfachen Abscheidung, die gegebenenfalls unter Anwesenheit von Vernetzer durchgeführt wird, entstehen liposomale Nanokapseln, wie sie in der WO 00/28972 oder in  
5 der WO01/64330 beschrieben sind. Vorteilhaft bei der Verwendung der hier beschriebenen Substanzen ist die Tatsache, dass die elektrostatische Interaktion mit dem Polyelektrolyten unterbrochen werden kann. Es ist bekannt, dass die Wechselwirkung eines Polyelektrolyten mit  
10 Ladungsträgern der liposomalen Membran zur Entmischung von Membranbestandteilen und zur Bildung von Lipidclustern führen kann. In vielen Fällen geht diese Entmischung mit einer Permeabilisierung des Liposoms einher. Die erfindungsgemäßen Substanzen ermöglichen eine Abschaltung dieser Wechselwirkung  
15 nach dem Beschichtungsprozess. Wird der pH-Wert zu diesem Zeitpunkt erhöht, so sind die Liposomen nur noch sterisch in der Nanokapseln eingeschlossen, eine Wechselwirkung der Membran mit den Polyelektrolyten besteht dann nicht mehr. Clusterbildung der Lipide und damit verbundene  
20 Permeabilisierung der Membran können so umgangen werden.

Es wurde überraschend gefunden, dass Liposomen, deren Membran die erfindungsgemäßen Substanzen enthalten, unterhalb des isoelektrischen Punktes der Substanz leicht mit anderen  
25 Membranen, insbesondere Zellmembranen fusionieren. Für gewöhnlich erfordert dieser Schritt die Anwesenheit eines größeren Anteils von PE in der Membran. Dieses hat durch seine Neigung zur Bildung von hexagonalen Phasen die Funktion eines Helferlipids. Nachteilig ist aber die geringere  
30 Stabilität solcher Membranen, hier wird oft eine schleichende Freisetzung von eingeschlossenen Wirkstoffen beobachtet.



Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen hergestellt werden, fusionieren vorteilhafterweise effektiv in Abwesenheit von Helferlipiden. Es sind also unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen Liposomen herstellbar, die einen Wirkstoff stabil verkapseln können, aber unter den Bedingungen eines niedrigen pH-Werts mit Zellmembranen fusionieren und dort den Wirkstoff freisetzen.

Diese Kombination zweier Eigenschaften stellt eine wichtige Voraussetzung für die Einbringung von Cargomolekülen in Zellen dar. Bei einer Fusion von Liposomen mit Zellhüllen oder -bestandteilen vereinigen sich die wässrigen Lumen beider Partner, ohne das es zu einer Öffnung der Membranstrukturen gegenüber dem Medium kommt. Dadurch wird der unkontrollierte Ein- oder Ausstrom anderer Substanzen vermieden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst der Anteil des Sterolderivats maximal 50 mol%. Besonders vorteilhaft sind Zusammensetzungen, die mindestens 2 mol%, höchstens aber 50 mol% der Sterolderivate umfassen. Weiter bevorzugt sind Zusammensetzungen, die mindestens 10 mol% und höchstens 40 mol% des Sterolderivats umfassen. Die Herstellung von Liposomen umfassend die erfinderischen Substanzen erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Techniken.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung umfassen die Liposomen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Diacylglycerol, Tetraetherlipid und/oder PEG-Lipid. Da Cholesterole selbst keine Liposomen ausbilden können, ist der Zusatz eines weiteren Lipids vorteilhaft. Dieses Lipid kann jedes Phospholipid sein. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass dieses Lipid

auch ein Ceramid oder Sphingolipid ist. Zweckmäßig kann es sein, das Lipid im polaren Teil mit Polyethylenglykol zu modifizieren.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung weisen die Liposomen eine mittlere Größe zwischen 50 und 1000 nm, bevorzugt zwischen 50 und 300 nm, besonders bevorzugt zwischen 60 und 130 nm auf.
- 10 Zweckmäßig ist es, in die Liposomen Wirkstoffe einzuschließen. Sie können z.B. in der Krebstherapie und zur Therapie schwerer Infektionen verwendet werden. Liposomendispersionen können dazu injiziert, infundiert oder implantiert werden. Sie verteilen sich danach im Blut oder in
- 15 der Lymphe oder geben als Depot ihren Wirkstoff kontrolliert ab. Letzteres kann durch hochkonzentrierte Dispersionen erreicht werden, die als Gele vorliegen. Die Liposomen können auch für topische Anwendung auf der Haut eingesetzt werden. Sie können insbesondere dazu beitragen, dass verschiedene
- 20 Wirkstoffe besser in die Haut eindringen können oder sogar durch die Haut in den Körper gelangen können. Weiterhin ist es möglich die Liposomen für den Gentransfer einzusetzen. Genetisches Material kann wegen seiner Größe und Ladung meist nicht ohne Hilfsmittel in Zellen gelangen. Dazu bedarf es
- 25 geeigneter Träger wie z.B. Liposomen oder Lipid-Komplexen. Diese sollen zusammen mit der DNA effizient und möglichst gezielt in die betroffenen Zellen aufgenommen werden. Dazu werden zelleigene Transportmechanismen wie die Endozytose herangezogen. Die erfindungsgemäßen Liposomen sind
- 30 selbstverständlich auch als Modellmembranen einsetzbar. Liposomen sind in ihrer prinzipiellen Struktur den Zellmembranen sehr ähnlich. Sie können daher als Membranmodelle eingesetzt werden, um die

Permeationsgeschwindigkeit von Wirkstoffen durch Membranen oder die Membranbindung von Wirkstoffen zu quantifizieren. Besonders vorteilhaft ist es, wenn der Wirkstoff ein Protein, ein Peptid, eine DNA, eine RNA, ein antisense-Nukleotid und/oder ein Decoy-Nukleotid ist.

In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung sind mindestens 80% des Wirkstoffes in den Liposomen eingeschlossen. Nicht eingebaute, außen anhaftende Cargomoleküle können wenn nötig durch eine einfache Erhöhung des pH-Wertes entfernt werden. Dieser Schritt ist immer dann notwendig, wenn nicht eingebaute Cargomoleküle zu einer Aggregation der Liposomen führen. Vorteilhaft bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Komponenten ist die Tatsache, dass die eingeschlossenen Wirkstoffe nur für den Zeitraum des eigentlichen Einschlusses unter Bedingungen gebracht werden müssen, die eine Interaktion mit der Lipidschicht erlauben. Sobald die Lipidschicht in sich geschlossen bleibt, kann zu anderen Bedingungen gewechselt werden. Eine denkbare Inaktivierung von Wirkstoffen, insbesondere von Proteinen kann dadurch minimiert werden.

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen, wobei ein Bindungs-pH-Wert zur Verkapselung benutzt wird und ein zweiter pH-Wert zur Abtrennung der nicht gebundenen Wirkstoffe verwendet wird.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen, wobei die Liposomen bei einem bestimmten pH-Wert permeabilisiert und folgend verschlossen werden. Bevorzugt können insbesondere Permeabilitätsänderungen gezielt zur Beladung von Liposomen genutzt werden. Ein einzuschließender Wirkstoff kann dabei

unter Bedingungen hoher Permeabilität ins Medium zugegeben werden. Anschließend werden Bedingungen geringer Permeabilität eingestellt. Damit verbleibt der Wirkstoff im Innern der Liposomen. Nicht eingeschlossener Wirkstoff kann  
5 dann gegebenenfalls abgetrennt werden. Eine solche Permeabilitätsänderung kann an Liposomen oder an liposomalen Nanokapseln herbeigeführt werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der Liposomen in  
10 der Diagnostik und in Freisetzungssystemen. Die Liposomen können selbstverständlich auch in einem Detektionssystem verwendet werden. Insbesondere können die Liposomen mit Metallionen beladen werden, deren Fluoreszenz durch die Chelatisierung verstärkt wird, also beispielsweise Terbium-  
15 oder Europiumionen. Liposomen für diese Anwendung können selbstverständlich spezifitätsbestimmende Komponenten enthalten, also z.B. Antikörper, Lektine, Selektine, Rezeptoren oder Hormone oder RNA-Aptamere. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung  
20 ist die Anwesenheit dieser Metallionen auf das Lumen der Liposomen beschränkt, um unspezifische Signale von außen anhaftendem und langsam freigesetztem Metallionen zu vermeiden. Zweckmäßig ist es auch, die Liposomen zur Herstellung von Nanokapseln zu verwenden. Mit Vorteil können  
25 die Liposomen zur Herstellung von Freisetzungssystemen in der Diagnostik verwendet werden. Zweckmäßig ist auch die Verwendung zum Transport und/oder zur Freisetzung von Wirkstoffen. Vorteilhafterweise können die Liposomen als Depotformulierung und/oder als zirkulierbares Depot verwendet  
30 werden. Vorteilhaft ist weiterhin die Verwendung der Liposomen als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in vitro und/oder ex vivo. Die Liposomen sind beispielsweise bei intravenöser und/oder peritonealer Applikation verwendbar.

Die erfindungsgemäßen Sterolderivate und Liopsomen weisen mehrere Vorteile auf. Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass die Permeabilität der erfindungsgemäßen Liposomen vom pH-Wert und damit vom Ladungszustand des Sterolderivats abhängig ist. Wird beispielsweise Hist-Chol verwendet, so werden Liposomen umfassend ein Phosphatidylethanolamin bei einem pH-Wert von 5 bis 6 so permeabilisiert, dass eingeschlossene Wirkstoffe oder Marker innerhalb von Minuten bis Stunden ausdiffundieren. In anderen pH-Bereichen sind diese Membranen für sich genommen jedoch stabil und zeigen nur eine geringe Anfangspermeabilität. Liposomen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Strukturen sind daher insbesondere geeignet zur Konstruktion von Freisetzungssystemen, bei denen eine Abgabe von Wirkstoffen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums erfolgen soll. Es wurde darüber hinaus überraschenderweise gefunden, dass in Liposomen, deren Membran die Sterolderivate umfasst, überdurchschnittlich hohe Mengen an Proteinen oder DNA eingeschlossen werden können. Die Effizienz dieses Einbaus ist dabei abhängig vom pH-Wert der verwendeten Lösung. Ein Prozess für die effiziente Verkapselung von Proteinen oder DNA in die Liposomen kann daher so geführt werden, dass zunächst ein pH-Wert eingestellt wird, der zu einer guten Bindung der Cargomoleküle an die Lipidschicht führt. Für DNA als Polyanion werden hier niedrige pH-Werte von etwa 4 bis 5 verwendet. Bei Proteinen richtet sich der nutzbare pH-Wert nach dem isoelektrischen Punkt des Proteins. Dieser sollte unterhalb des isoelektrischen Punktes der erfindungsgemäßen Substanz liegen. Eine Verkapselung ist dann besonders effektiv, wenn der pH-Wert des Mediums so gewählt wird, dass er zwischen dem isoelektrischen Punkt des Proteins und dem

isoelektrischen Punkt des Sterolderivates liegt. Das Protein ist dann negativ und die Lipidschicht ist positiv geladen.

Weiterhin wurde überraschend gefunden, dass Liposomen, deren  
5 Membran beispielsweise Hist-Chol umfasst, zur Chelatisierung von Metallionen befähigt sind. Diese Eigenschaft führt zu einer Verstärkung der positiven Ladung des Liposoms. Dieser Effekt ist besonders stark bei neutralen pH-Werten zu beobachten, da dann die Eigenladung der Verbindung gering  
10 ist. Aufgrund ihrer chelatisierenden Eigenschaften lassen sich solche Liposomen in der biochemischen Diagnostik und zur pharmazeutischen Therapie verwenden.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Verwendung von  
15 Liposomen für experimentelle oder therapeutische Zwecke ist deren Verträglichkeit mit Zellen und Geweben. Eine Reihe bekannter Verbindungen, die für das Einbringen von DNA oder Proteinen in Zellen genutzt werden (beispielsweise das kationische Lipid DOTAP) sind zytotoxisch. Es wurde  
20 überraschenderweise gefunden, dass einige der erfindungsgemäßen Verbindungen eine verringerte Zytotoxizität zeigen. Das betrifft insbesondere die Gruppe von Verbindungen, bei denen das Amphoter eine Aminosäure oder ein Peptid ist. Diese erfüllen daher eine der Voraussetzungen  
25 eines Transfektionssystems.

Eine weitere Voraussetzung für die Konstruktion von Vektoren zum Gen- oder Proteintransport in Zellen ist deren Kompatibilität mit Serum oder Blut. Wegen ihrer starken  
30 kationischen Ladung bilden die derzeit bekannten Vektoren mit Serum unkontrollierte große Aggregate, die im Organismus zur Bildung von Thromben führen. Ihre Verwendung ist damit in vivo praktisch ausgeschlossen und auf in vitro oder ex vivo Anwendungen beschränkt. Es wurde überraschenderweise

gefunden, dass Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Komponenten aufgebaut wurden, in Serum oder Blut keine Aggregate bilden. Das sind insbesondere solche Liposomen, deren isoelektrischen Punkt kleiner als 7,5 ist.

5

Eine weitere Voraussetzung für die Konstruktion von Vektoren zum Protein- oder Gentransfer ist deren Stabilität unter physiologischen Bedingungen. Liposomen werden bei einer Applikation in den Blutkreislauf vom Bestandteilen des  
10 Complementsystems angegriffen und schnell lysiert. Diese Reaktion erfolgt binnen Minuten. Es kommt zur Porenbildung in der Membran, durch die selbst große Moleküle wie Proteine ausdiffundieren können. Eine Stabilisierung von Liposomen gegenüber diesen Mechanismen ist bisher nur durch Einbau von  
15 Cholesterol in die Lipidschicht möglich. Solche Liposomen sind dann sehr stabil, können aber nicht mehr mit Zellen wechselwirken oder ihren Wirkstoff leicht abgeben. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Komponenten aufgebaut  
20 werden, in Serum oder Blut über mehrere Stunden stabil sein können. Die Wirkstofffreisetzung ist auch unter diesen Bedingungen gering. Eine liposomaler Vektor für den Transport von Wirkstoffen muss mindestens drei Voraussetzungen erfüllen: er muss eine geringe Toxizität besitzen, den  
25 Wirkstoff sicher und stabil einschließen und kompatibel mit Serum oder Blut sein.

Alle drei dieser Voraussetzungen werden von Liposomen, die unter Verwendung ausgewählter erfindungsgemäßer Substanzen  
30 hergestellt sind, mit Vorteil erfüllt. Die Liposomen sind daher für eine Verwendung bei therapeutischen Zwecken gut geeignet. Weitere Eigenschaften, die diese Verwendung unterstützen, sind die gute Beladbarkeit mit Wirkstoffen und

die gezielte Ablösung dieser Stoffe durch Veränderungen des pH-Werts oder durch Permeabilisierung der Membran. Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen hergestellt werden, zeigen nur eine geringe unspezifische Bindung an Zelloberflächen. Diese geringe unspezifische Bindung ist eine wesentliche Voraussetzung für das Zustandekommen einer spezifischen Bindung an Zielzellen. Werden die beschriebenen Liposomen mit weiteren Liganden versehen, so ist eine Zielsteuerung der Vehikel gegeben. Der Wirkstoff kann dann spezifisch an solchen Zellen oder Geweben angereichert werden, die pathologische Zustände aufweisen.

Eine wesentliche Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen liegt daher bei der Konstruktion von Vektoren für den Wirkstofftransfer in lebenden Organismen. Die Vektoren sind besonders geeignet für den Transport von therapeutischen Makromolekülen wie etwa Proteinen oder DNA, die von sich aus nicht die Zellmembran überwinden können oder im Blutstrom schnell abgebaut werden.

Die Erfindung soll im folgenden anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne dass die Erfindung auf diese Beispiele zu beschränken ist.



**Beispiel 1****Synthese Cholesteryl-L-histidylsuccinat (Hist-chol)**

Stufe I, Aktivierung des Cholesterylhemisuccinates: 11,3 mmol  
5 (2,3 g) Dicyclohexylcarbodiimid werden in einem 100 ml Kolben  
mit 40 ml THF vorgelegt und auf -10°C gekühlt. 10,3 mmol (5  
g) Cholesterinhemisuccinat und 11,3 mmol (1,3 g) N-  
Hydroxysuccinimid werden hinzugegeben. Man lässt die Mischung  
auf RT auftauen und rührt 5 h. Danach wird der gebildete  
10 Niederschlag abgetrennt (Harnstoff), das Filtrat eingeeengt  
und der Rückstand aus Essigester umkristallisiert. Farblose  
Nadeln, mp: 145-146 °C, 93 %.

Stufe II, Cholesteryl-L-histidylsuccinate: 5,1 mmol (3 g)  
15 des aktivierten Esters (Stufe I) werden in 40 ml DMF  
vorgelegt. In 10 ml Wasser werden 7,6 mmol (0,6 g)  
Natriumhydrogencarbonat und 7,6 mmol (1,2 g) Histidin gelöst.  
Diese Lösung wird langsam zur DMF-Suspension getropft. Es  
wird 20 h gerührt und danach pH 4-5 mit 2N HCl eingestellt.  
20 Die Reaktionsmischung wird bis zur Trockene eingeeengt und das  
Produkt mit heißem Ethanol extrahiert. Nach Abziehen des  
Ethanol fällt das Produkt rein an. Farbloser Feststoff, 78  
%.

25

**Beispiel 2****Herstellung von amphoteren Liposomen**

5 mg Hist-Chol und 9.8 mg POPC werden in 4 mL  
30 Chloroform/Methanol (1:1 v/v) gelöst und im  
Rotationsverdampfer vollständig getrocknet. Der Lipidfilm  
wird mit 4.3 mL des entsprechenden Puffers (10 mM Kac, 10 mM  
HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5 in einer Lipidkonzentration von 5

mM durch 5 min Ultraschallbehandlung hydratisiert. Abschließend wird die Suspension eingefroren und nach dem Auftauen mehrfach extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonatfilter 200nm Porenweite). Der Verlauf des  
5 Zetapotentials in mV bei verschiedenen pH-Werten ist in der untenstehenden Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

pH-Wert	0mM NaCl	100mM NaCl
4,0	+42	-20
5,0	+28	+2
6,0	-5	-6
7,0	-32	-15
8,0	-45	-25

10

### Beispiel 3

#### Permeabilität

Lipidfilme der Zusammensetzung DMPE/Hist-Chol 60: 40 mol%  
15 wurden analog Beispiel 2 hergestellt und mit 100 mM 6-Carboxyfluorescein (CF), 50 mM NaCl, Hepes 10 mM, pH 8 hydratisiert, so dass eine Lipidkonzentration von 25 mM resultiert. Nichteingeschlossenes CF wurde durch Gelfiltration entfernt. Für die pH- und zeitabhängigen  
20 Permeabilitätsmessungen wurden die Liposomen auf 0,2 mM in Puffer des jeweiligen pHs verdünnt und nach 30 bzw. 60 min die Fluoreszenz gemessen. Dann wurde die Temperatur auf 37°C erhöht und nach den gleichen Zeitintervallen (30, 60 min) gemessen. Anschließend wurde die Temperatur auf 60°C erhöht  
25 und wieder nach 30 und 60 min gemessen. Die prozentuale Freisetzung von CF ist in der untenstehenden Tabelle 3 zusammengefaßt. Man erkennt deutlich eine Permeabilisierung

bei pH 6,5, ein Wert, der dem isoelektrischen Punkt von Hist-Chol sehr nahe kommt. Oberhalb und unterhalb dieses pH-Wertes sind die Membranen überraschend stabil.

5

Tabelle 3

	0 min	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
				(37°C)	(37°C)	(60°C)	(60°C)
PH 8.0	29%	29%	28%	30%	30%	36%	41%
pH 7.0	32%	36%	46%	39%	44%	52%	60%
pH 6.5	53%	70%	81%	110%	132%	185%	180%
pH 6.0	29%	25%	26%	26%	27%	30%	33%
pH 5.5	28%	26%	27%	26%	27%	30%	32%
pH 5.0	39%	41%	43%	52%	61%	98%	115%

10

#### Beispiel 4

##### Bindung von DNA an amphotere Liposomen

- 15 Die in  $\text{KAc}^{10}\text{HEP}^{10}\text{NaCl}^{100}$ , pH 8, nach Beispiel 2 hergestellten Liposomen aus POPC/Hist-Chol 60:40 (mol%) wurden zur DNA-Bindung auf 0.2 mM mit dem zu untersuchenden Puffer verdünnt. DNA (HeringsDNA 1mg/ml-Stammlösung in Wasser) wurde in entsprechenden Mengen vorgelegt. Anschließend wurde
- 20 1 ml 0.2 mM Liposomen zugegeben. Die Mischung wurde schnell gemischt und nach 15 min die Partikelgröße und das Zetapotential durch dynamische Lichtstreuung bestimmt. Bei richtig gewählter DNA-Menge bleibt die Partikelgröße fast unverändert.

25

Bei den pH-Werten 7 und 8, bei denen die POPC/HistChol 60:40 Liposomen negativ geladen sind, war keine Änderung in Größe bzw. Zetapotential zu erkennen, was eine Bindung von DNA ausschließt. Bei pH 4 und 5 sind die Liposomen stark positiv geladen und es kommt durch die DNA-Bindung zur Umladung der Partikel. Bei pH 6 sind die Liposomen nur schwach geladen, nach DNA-Zugabe stark negativ. Um diese Umladung zu erreichen muß erheblich mehr DNA addiert werden. Die Zetapotentiale und die dazugehörigen adsorbierten Mengen DNA sind in der untenstehenden Tabelle 4 zusammengefasst:

**Tabelle 4**

pH-Wert	Zetapotential	ohne/mit Adsorbierte	
	DNA (mV)	Menge	DNA
(µg/mg Lipid)			
4	41,3	-37,7	15
5	19,6	-44,7	15
6	-4,2	-36,7	40
7	-36,8	-35	--
8	-52,2	-52,9	--

Aus der Bindungscharakteristik kann ebenfalls abgeleitet werden, dass eine Ablösung nicht eingeschlossener, aussen anhaftender DNA durch Erhöhung des pH erreicht wird.

## Beispiel 5

### Stabilität in Humanserum

Liposomen der Zusammensetzung POPC/HistChol 60:40 wurden analog Beispiel 2 als 5 mM Suspension hergestellt. Der Serumtest wurde als Verdünnungsreihe durchgeführt.

Unterschiedliche Liposomenmengen (50 - 250  $\mu$ l) wurden mit dem gleichen Volumen Humanserum (250 $\mu$ l) für 5 min bei 37°C inkubiert (das Gesamtvolumen wurde durch Addition von 150 mM NaCl immer auf konstant 500 $\mu$ l gebracht). Zur Messung der Partikelgröße mit dynamischer Lichtstreuung wurde die Mischung dann 1:9 mit Puffer (KAc10 Hep10 NaCl100; pH 8) verdünnt. Die Daten sind in der untenstehenden Tabelle zusammengestellt. Die gemessene Partikelgröße nähert sich dem Serumwert an, je konzentrierter das Serum ist. Die Bildung von großen (> 1 $\mu$ m) Aggregaten wurde nicht beobachtet (Tabelle 5).

Tabelle 5

Probe	Partikelgröße	Polydispersität
250 $\mu$ l Serum + x $\mu$ l Liposomen	(nm)	
250	94	0,574
125	89	0,584
50	81	0,589
Nur Serum	70	0,613
Nur Liposomen	119	0,155

## Beispiel 6

## Pharmakokinetik im Blut

Je 500  $\mu$ L Liposomen aus POPC/Chol und POPC/Hist-Chol wurden männlichen Wistar-Ratten per Injektion in die Schwanzvene verabreicht.

50 mM Liposomen-Suspensionen wurden hergestellt durch Hydratisieren eines Lipidfilms der entsprechenden

Formulierung (Addition von 0,03 mol% [14]C-DPPC) mit 2 mL einer Lösung von 1 mg [3]H-Inulin in HEPES 10 mM, NaCL 150 mM, pH 8). Nach 3 Einfrier/Auftau-zyklen wurden die Suspensionen durch eine 400 nm-Membran mehrfach extrudiert  
5 (LiposoFast, Avestin). Abtrennung von nichteingeschlossenem [3]H-Inulin erfolgte durch Gelfiltration über eine G-75 Sephadex-Säule und anschließende Konzentrierung über CENTRIPREP (Millipore) Zentrifugationseinheiten.4 Versuchstieren je Formulierung wurden 0,5 mL  
10 Liposomensuspension verabreicht und Blutproben nach 5 min, 15 min, 60 min, 3 h, 12 h, 24 h genommen. Ca. 50 -100 mg der Blutproben wurden in 1 mL SOLVABLE-Gewebelöser (PACKARD) bei 50°C für 1-3 h aufgelöst und anschließend mit 0,1-0,5 mL 30% Wasserstoffperoxyd-Lösung entfärbt. Danach wurden 10 mL  
15 Szintillator hinzugefügt und die Aktivität von [3]H und [14]C gemessen. Eine unmittelbare toxische Wirkung der Verbindungen war nicht nachzuweisen.

Eliminationshalbwertszeiten aus dem Blut:

20 POPC/Chol größer 120 min  
POPC/Hist-Chol größer 90 min

### Patentansprüche

- 5        1. Sterolderivat mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4,5 und 8,5 nach der allgemeinen Formel  
Amphoter - Y - Spacer - X - Sterol, wobei Y und X verbindende Gruppen darstellen.
- 10       2. Sterolderivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Sterolderivat einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 aufweist.
- 15       3. Sterolderivat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Amphoter mindestens ein kationisches Ladungsteil mit einem pKa-Wert zwischen 4 bis 8 und/oder mindestens ein anionisches Ladungsteil mit einem pKa-Wert zwischen 3 bis 7 umfasst.
- 20       4. Sterolderivat nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das kationische Ladungsteil Imidazol, Piperazin, Morphin, Purin und/oder Pyrimidin und/oder Fragmente dieser umfasst.
- 25       5. Sterolderivat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das anionische Ladungsteil eine Carboxylgruppe umfasst.
- 30       6. Sterolderivat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Amphoter ein Peptid mit 1-10 Aminosäuren umfasst.

7. Sterolderivat nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Histidin, Arginin, Lysin, Glutaminsäure und/oder Asparaginsäure.
- 5
8. Sterolderivat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Sterol ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Cholesterol, Sitosterol, Campesterol, Desmosterol, Fucosterol, 22-Ketosterol, 20-Hydroxysterol, Stigmasterol, 22-Hydroxycholesterol, 10 25-Hydroxycholesterol, Lanosterol, 7-Dehydrocholesterol, Dihydrocholesterol, 19-Hydroxycholesterol, 5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol, 7-Hydroxycholesterol, Epicholesterol, Ergosterol und/oder 15 Dehydroergosterol.
9. Sterolderivat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die verbindenden Gruppen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus -(C=O)-O-, 20 -(C=O)-NH-, -NH-(C=O)-O-, -(C=O)-S-, -O-, -NH-, -S-, -CH=N-, -O-(O=C)-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)-; -O-(O=C)-NH- und/oder -N=CH-.
10. Sterolderivat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, 25 dadurch gekennzeichnet, dass der Spacer einen Niederalkylrest mit bis zu 8 C-Atomen umfasst, der eine lineare, verzweigte oder ringförmige Struktur hat und 0, 1, oder 2 Doppelbindungen aufweist.
- 30 11. Liposomen umfassend Sterolderivate nach einem der Ansprüche 1 bis 10.



12. Liposomen nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen maximal 50 mol% des Sterolderivats umfassen, bevorzugt 2 bis 50 mol%, besonders bevorzugt 10 bis 40 mol%.

5

13. Liposomen nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Diacylglycerol, Tetraetherlipid und/oder PEG-Lipid umfassen.

10

14. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen eine mittlere Größe zwischen 50 und 1000 nm, bevorzugt zwischen 50 und 300 nm, besonders bevorzugt zwischen 60 und 130 nm aufweisen.

15

15. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen einen Wirkstoff umfassen.

20

16. Liposomen nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein Protein, ein Peptid, eine DNA, eine RNA, ein antisense-Nukleotid und/oder ein Decoy-Nukleotid ist.

25

17. Liposomen nach dem Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 80% des Wirkstoffes im Innern des Liposoms eingeschlossen sind.

30

18. Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass ein Bindungs-pH-Wert zur Verkapselung von Wirkstoffen eingesetzt wird und ein zweiter pH-Wert zur

Abtrennung der nicht gebundenen Wirkstoffe verwendet wird.

- 5 19. Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen bei einem bestimmten pH-Wert permeabilisiert und folgend verschlossen werden.
- 10 20. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17 zur Herstellung von Nanokapseln.
- 15 21. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17 zur Herstellung von Freisetzungssystemen in der Diagnostik.
22. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17 zum Transport und zur Freisetzung von Wirkstoffen.
- 20 23. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17 als Depotformulierung und/oder als zirkulierbares Depot.
- 25 24. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17 als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in vitro und/oder ex vivo.
- 30 25. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17 bei intravenöser und/oder peritonealer Applikation.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/066489 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07J 41/00**,  
A61K 9/127

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01878

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. Februar 2002 (21.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 09 898.7 21. Februar 2001 (21.02.2001) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **NOVOSOM AG** [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).

Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **PANZNER, Steffen** [DE/DE]; Blumenstrasse 9, 06108 Halle (DE). **ENDERT, Gerold** [DE/DE]; Seebener Strasse 20, 06114 Halle (DE). **FANKHÄNEL, Stefan** [DE/DE]; Herderstrasse 9, 06114 Halle (DE). **EL-MOKDAD, Nasr** [DE/DE]; Bertranstrasse 10, 06110 Halle (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 3. Januar 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwälte: **ZIEBIG, Marlene, K.** usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstrasse 15 - 17, 10117 Berlin (DE).



**A3**  
**WO 02/066489**

(54) Title: AMPHOTERIC STEROLS AND THE USE THEREOF IN THE PRODUCTION OF PH-SENSITIVE LIPOSOMES

(54) Bezeichnung: AMPHOTERE STEROLE UND DEREN VERWENDUNG ZUR HERSTELLUNG VON PH- SENSITIVEN LIPOSEMEN

(57) Abstract: The invention relates to a sterol skeleton based compound wherein one or several amphoteric groups with an iso-electric point of between 4 and 9 are substituted on the 3<sup>rd</sup> position of the ring system, in addition to liposomes containing said compounds.

(57) Zusammenfassung: Es wird eine amphotere Verbindung auf Basis eines Sterolgerüsts vorgeschlagen, wobei an die 3-Position des Ringsystems eine oder mehrere amphotere Gruppen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 9 substituiert sind sowie Liposomen, die diese Verbindungen enthalten.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 7 C07J41/00 A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07J A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 59474 A (LEAMON CHRISTOPHER PAUL ;ISIS PHARMACEUTICALS INC (US)) 12 October 2000 (2000-10-12) cited in the application page 4, line 24 -page 5, line 30 page 16; examples 6,8 ---	1-25
X	LI, ZI CHEN ET AL: "Synthesis of cholesterol derivatives with amino acid as hydrophilic group and the vesicles prepared therefrom" CHINESE CHEMICAL LETTERS (1999), 10(12), 1007-1010 , XP008005314 page 1008, scheme 1, compounds I-III page 1009, last paragraph page 1010; figure 2 --- -/--	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 July 2002

Date of mailing of the international search report

22/08/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Watchorn, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International Application No

PCT/EP 02/01878

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 43994 A (GENZYME CORP) 8 October 1998 (1998-10-08) page 12, compound 130 page 39, paragraph 1; figure 4; example 1	1-25
X	NASTRUZZI C ET AL: "Liposomes as carriers for DNA-PNA hybrids" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 68, no. 2, 10 August 2000 (2000-08-10), pages 237-249, XP004228954 ISSN: 0168-3659 page 241; examples LYS4-CHOL page 239, column 1, paragraph 2.2 page 247, column 2, paragraph 2	1-25
X	WO 96 11023 A (COCKBAIN JULIAN R M ;NYCOMED SALUTAR INC (US); WATSON ALAN DAVID ( ) 18 April 1996 (1996-04-18) page 5, paragraph 1; examples 10,21	1-3,5, 8-14,21
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ISHIKURA, TOYOAKI ET AL: "Preparation of peptide-lipid derivatives and liposomes containing the derivatives" retrieved from STN Database accession no. 122:161385 XP002204265 abstract & JP 06 219967 A (DDS KENKYUSHO KK, JAPAN) 9 August 1994 (1994-08-09)	1-3,5-14
X	WO 00 09073 A (EKWURIBE NNOCHIRI N ;PRICE CHRISTOPHER H (US); AUSARI ASLAM M (US)) 24 February 2000 (2000-02-24) page 1, paragraph 1 page 10	1-3,5-10
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; LANDAU, EHUD M. ET AL: "Transfer of structural information from Langmuir monolayers to three-dimensional growing crystals" retrieved from STN Database accession no. 104:99668 XP002204266 abstract & NATURE (LONDON) (1985), 318(6044), 353-6 , --- -/--	1-3,5-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01878

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 993 823 A (GRAS-MASSE HELENE ET AL) 30 November 1999 (1999-11-30) column 5 ----	1-3,5-10
X	WO 00 30688 A (BRACCO INT BV) 2 June 2000 (2000-06-02) example 16 ----	1-3,5-10
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; PLEURDEAU, A. ET AL: "Synthesis of polymers with pharmacological properties. Introduction of peptide sequences into the macromolecular chain" retrieved from STN Database accession no. 96:69405 XP002204267 abstract & EUR. POLYM. J. (1981), 17(9), 999-1003 , ----	1-3,5-10
Y	BUDKER V ET AL: "PH-SENSITIVE, CATIONIC LIPOSOMES: A NEW SYNTHETIC VIRUS-LIKE VECTOR" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 14, June 1996 (1996-06), pages 760-764, XP002937150 ISSN: 0733-222X page 761, Verbindung ChIm page 761, column 2, last paragraph -page 762, column 1, paragraph 1; figure 3 ----	1-25
Y	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HAFEZ, ISMAIL M. ET AL: "Tunable pH - sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids" retrieved from STN Database accession no. 133:355087 XP002204268 abstract & BIOPHYSICAL JOURNAL (2000), 79(3), 1438-1446 , ----- -/--	1-25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01878

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LI, XIAO-JUN ET AL: "Theory of tunable pH sensitive vesicles of anionic and cationic lipids or anionic and neutral lipids" LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY, PREPRINT ARCHIVE, CONDENSED MATTER (2000) 1-16, ARXIV:COND-MAT/0009267, 22 SEP 2000 , 'Online! 22 September 2000 (2000-09-22), XP002204264 Retrieved from the Internet: &lt;URL:http://xxx.lanl.gov/pdf/cond-mat/0009267&gt; 'retrieved on 2002-06-28! page 2, last paragraph -page 3, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP02/01878

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although Claims 24 and 25 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the stated effects of the compound or composition.
2. ☒ Claims Nos.: **Claims 1-25 (in part)**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



Box I.2

## Claims 1-25 (in part)

In its initial stages the search revealed a very large number of novelty-destroying documents. The number of these documents is so great that it is impossible to determine the scope of protection that can legitimately be sought by the claims taken as a whole (PCT Article 6). For this reason it does not seem possible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought. The search was therefore confined to the use of the claimed compounds for the production of pH-sensitive liposomes and to the compounds defined in Claim 7.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 02/01878

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0059474	A	12-10-2000	US 6379698 B1 AU 4221400 A EP 1165047 A1 WO 0059474 A1	30-04-2002 23-10-2000 02-01-2002 12-10-2000
WO 9843994	A	08-10-1998	US 5925628 A AU 6784698 A WO 9843994 A1	20-07-1999 22-10-1998 08-10-1998
WO 9611023	A	18-04-1996	AU 1852995 A EP 0748229 A1 WO 9611023 A1 JP 9510239 T US 5976493 A AU 3613695 A CA 2200867 A1 CN 1168636 A EP 0785804 A1 JP 10507172 T US 6045821 A	25-09-1995 18-12-1996 18-04-1996 14-10-1997 02-11-1999 02-05-1996 18-04-1996 24-12-1997 30-07-1997 14-07-1998 04-04-2000
JP 6219967	A	09-08-1994	JP 2579730 B2	12-02-1997
WO 0009073	A	24-02-2000	AU 5672699 A BR 9914280 A CN 1323213 T EP 1105142 A2 WO 0009073 A2	06-03-2000 13-11-2001 21-11-2001 13-06-2001 24-02-2000
US 5993823	A	30-11-1999	FR 2670787 A1 AT 185148 T CA 2057828 A1 DE 69131662 D1 DE 69131662 T2 DK 491628 T3 EP 1065212 A2 EP 0491628 A2 EP 0945461 A1 ES 2137160 T3 GR 3031889 T3 JP 4295498 A SG 63621 A1 US 6015564 A US 5871746 A	26-06-1992 15-10-1999 19-06-1992 04-11-1999 06-04-2000 10-04-2000 03-01-2001 24-06-1992 29-09-1999 16-12-1999 29-02-2000 20-10-1992 16-11-1999 18-01-2000 16-02-1999
WO 0030688	A	02-06-2000	EP 1153029 A2 WO 0030688 A2 US 6342598 B1	14-11-2001 02-06-2000 29-01-2002

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07J41/00 A61K9/127

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07J A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 59474 A (LEAMON CHRISTOPHER PAUL ; ISIS PHARMACEUTICALS INC (US)) 12. Oktober 2000 (2000-10-12) in der Anmeldung erwähnt Seite 4, Zeile 24 -Seite 5, Zeile 30 Seite 16; Beispiele 6,8	1-25
X	LI, ZI CHEN ET AL: "Synthesis of cholesterol derivatives with amino acid as hydrophilic group and the vesicles prepared therefrom" CHINESE CHEMICAL LETTERS (1999), 10(12), 1007-1010, XP008005314 page 1008, scheme 1, compounds I-III Seite 1009, letzter Absatz Seite 1010; Abbildung 2	1-25

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Juli 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/08/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Watchorn, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 43994 A (GENZYME CORP) 8. Oktober 1998 (1998-10-08) page 12, compound 130 Seite 39, Absatz 1; Abbildung 4; Beispiel 1 ---	1-25
X	NASTRUZZI C ET AL: "Liposomes as carriers for DNA-PNA hybrids" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 68, Nr. 2, 10. August 2000 (2000-08-10), Seiten 237-249, XP004228954 ISSN: 0168-3659 Seite 241; Beispiele LYS4-CHOL Seite 239, Spalte 1, Absatz 2.2 Seite 247, Spalte 2, Absatz 2 ---	1-25
X	WO 96 11023 A (COCKBAIN JULIAN R M ;NYCOMED SALUTAR INC (US); WATSON ALAN DAVID ( ) 18. April 1996 (1996-04-18) Seite 5, Absatz 1; Beispiele 10,21 ---	1-3,5, 8-14,21
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ISHIKURA, TOYOAKI ET AL: "Preparation of peptide-lipid derivatives and liposomes containing the derivatives" retrieved from STN Database accession no. 122:161385 XP002204265 Zusammenfassung & JP 06 219967 A (DDS KENKYUSHO KK, JAPAN) 9. August 1994 (1994-08-09) ---	1-3,5-14
X	WO 00 09073 A (EKWURIBE NNOCHIRI N ;PRICE CHRISTOPHER H (US); AUSARI ASLAM M (US)) 24. Februar 2000 (2000-02-24) Seite 1, Absatz 1 Seite 10 --- -/--	1-3,5-10

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE CA 'Online!            CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,            OHIO, US;            LANDAU, EHUD M. ET AL: "Transfer of            structural information from Langmuir            monolayers to three-dimensional growing            crystals"            retrieved from STN            Database accession no. 104:99668            XP002204266            Zusammenfassung            &amp; NATURE (LONDON) (1985), 318(6044), 353-6            ,</p>	1-3,5-10
X	<p>---            US 5 993 823 A (GRAS-MASSE HELENE ET AL)            30. November 1999 (1999-11-30)            Spalte 5</p>	1-3,5-10
X	<p>---            WO 00 30688 A (BRACCO INT BV)            2. Juni 2000 (2000-06-02)            Beispiel 16</p>	1-3,5-10
X	<p>---            DATABASE CA 'Online!            CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,            OHIO, US;            PLEURDEAU, A. ET AL: "Synthesis of            polymers with pharmacological properties.            Introduction of peptide sequences into the            macromolecular chain"            retrieved from STN            Database accession no. 96:69405            XP002204267            Zusammenfassung            &amp; EUR. POLYM. J. (1981), 17(9), 999-1003 ,</p>	1-3,5-10
Y	<p>---            BUDKER V ET AL: "PH-SENSITIVE, CATIONIC            LIPOSOMES: A NEW SYNTHETIC VIRUS-LIKE            VECTOR"            BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW            YORK, US,            Bd. 14, Juni 1996 (1996-06), Seiten            760-764, XP002937150            ISSN: 0733-222X            page 761, Verbindung ChIm            Seite 761, Spalte 2, letzter Absatz -Seite            762, Spalte 1, Absatz 1; Abbildung 3            ---            -/--</p>	1-25

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>DATABASE CA 'Online!            CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,            OHIO, US;            HAFEZ, ISMAIL M. ET AL: "Tunable pH -            sensitive liposomes composed of mixtures            of cationic and anionic lipids"            retrieved from STN            Database accession no. 133:355087            XP002204268            Zusammenfassung            &amp; BIOPHYSICAL JOURNAL (2000), 79(3),            1438-1446 ,</p>	1-25
Y	<p>LI, XIAO-JUN ET AL: "Theory of tunable pH            sensitive vesicles of anionic and cationic            lipids or anionic and neutral lipids"            LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY, PREPRINT            ARCHIVE, CONDENSED MATTER (2000) 1-16,            ARXIV:COND-MAT/0009267, 22 SEP 2000 ,            'Online! 22. September 2000 (2000-09-22),            XP002204264            Gefunden im Internet:            &lt;URL:http://xxx.lanl.gov/pdf/cond-mat/0009            267&gt; 'gefunden am 2002-06-28!            Seite 2, letzter Absatz -Seite 3, Absatz 1</p>	1-25

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
  
Obwohl die Ansprüche 24-25 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-25 (teilweise)  
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-25 (teilweise)

Die Recherche ergab in ihrer Anfangsphase eine sehr große Zahl neuheitsschädlicher Dokumente. Diese Zahl ist so groß, daß sich unmöglich feststellen lässt, für was in der Gesamtheit der Patentansprüche eventuell nach zu Recht Schutz begehrt werden könnte (Art. 6 PCT). Aus diesen Gründen erscheint eine sinnvolle Recherche über den gesamten Bereich der Patentansprüche unmöglich. Die Recherche wurde daher beschränkt auf die Verwendung der beanspruchten Verbindungen zur Herstellung pH-Sensitiven Liposomen and auf die Verbindungen des Anspruchs 7.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0059474	A	12-10-2000	US 6379698 B1	30-04-2002
			AU 4221400 A	23-10-2000
			EP 1165047 A1	02-01-2002
			WO 0059474 A1	12-10-2000
WO 9843994	A	08-10-1998	US 5925628 A	20-07-1999
			AU 6784698 A	22-10-1998
			WO 9843994 A1	08-10-1998
WO 9611023	A	18-04-1996	AU 1852995 A	25-09-1995
			EP 0748229 A1	18-12-1996
			WO 9611023 A1	18-04-1996
			JP 9510239 T	14-10-1997
			US 5976493 A	02-11-1999
			AU 3613695 A	02-05-1996
			CA 2200867 A1	18-04-1996
			CN 1168636 A	24-12-1997
			EP 0785804 A1	30-07-1997
			JP 10507172 T	14-07-1998
			US 6045821 A	04-04-2000
JP 6219967	A	09-08-1994	JP 2579730 B2	12-02-1997
WO 0009073	A	24-02-2000	AU 5672699 A	06-03-2000
			BR 9914280 A	13-11-2001
			CN 1323213 T	21-11-2001
			EP 1105142 A2	13-06-2001
			WO 0009073 A2	24-02-2000
US 5993823	A	30-11-1999	FR 2670787 A1	26-06-1992
			AT 185148 T	15-10-1999
			CA 2057828 A1	19-06-1992
			DE 69131662 D1	04-11-1999
			DE 69131662 T2	06-04-2000
			DK 491628 T3	10-04-2000
			EP 1065212 A2	03-01-2001
			EP 0491628 A2	24-06-1992
			EP 0945461 A1	29-09-1999
			ES 2137160 T3	16-12-1999
			GR 3031889 T3	29-02-2000
			JP 4295498 A	20-10-1992
			SG 63621 A1	16-11-1999
			US 6015564 A	18-01-2000
			US 5871746 A	16-02-1999
WO 0030688	A	02-06-2000	EP 1153029 A2	14-11-2001
			WO 0030688 A2	02-06-2000
			US 6342598 B1	29-01-2002

